

PRODUCTION OF MICROSPHERE BY CROSSLINKING PROTEIN,

Publication number: JP2167222 (A)

Publication date: 1990-06-27

Inventor(s): JIYOSHIAANU AREKU; FUORANSU GODAIYU; JIAN
KUROODO JIAMUURU; BURAHAMU SHIYURUUTO +

Applicant(s): CIRD +

Classification:






- international: **A61K9/64; A61K8/04; A61K8/64; A61K8/65; A61K9/16;
A61Q19/00; A61Q19/10; B01J13/04; A61K9/52; A61K8/04;
A61K8/30; A61K9/16; A61Q19/00; A61Q19/10; B01J13/04;
(IPC1-7): A61K9/64; B01J13/04**

- European: **A61K8/04H; A61K8/64; A61K8/64C; A61K8/65; A61K9/16H6H;
A61Q19/00; A61Q19/10**

Application number: JP19890210801 19890817

Priority number(s): FR19880010942 19880817

Also published as:

 FR2635459 (A1)
 IT1232917 (B)
 GB2224258 (A)
 ES2018638 (A6)
 DE3927073 (A1)

Abstract of JP 2167222 (A)

PURPOSE: To obtain a uniform protein spherule by adding a carbodiimide to an emulsion comprising an organic solvent phase containing a surfactant and an aqueous liquid phase containing a protein to activate cross-linking. **CONSTITUTION:** An emulsion comprising a continuous phase composed of a surfactant (e.g. sorbitan ester)-containing organic solvent, preferably a 5-10°C aliphatic hydrocarbon or a 5-8°C cyclic aliphatic hydrocarbon and a discontinuous phase composed of a hydrophilic liquid phase containing at least one protein is prepared. The emulsion is mixed with a carbodiimide, preferably 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and cross-linking is activated to form precipitate of spherule. The precipitate is separated and cleaned to give a protein spherule. When a mixture of an aqueous phase and an organic solvent (e.g. dimethylformamide) to be mixed with water is used as the discontinuous liquid phase, a water-insoluble product such as a capsulated medicine can be produced.

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-167222

⑪ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)6月27日

A 61 K 9/64

D

7624-4C

B 01 J 13/04

8317-4C B 01 J 13/02

A

審査請求 未請求 請求項の数 26 (全8頁)

⑭ 発明の名称 蛋白質の架橋による微小球体の製造方法、得られた微小球体及びその用途

⑮ 特 願 平1-210801

⑯ 出 願 平1(1989)8月17日

優先権主張 ⑰ 1988年8月17日 ⑱ フランス(FR)⑲ 8810942

⑲ 発 明 者 ジョシアヌス、アレク フランス国アンティープ06600、シュマン・ド・ラ・シュケツト 300番 レ・ヴェルジェ・ド・ヴァル・コンスタン

⑲ 出 願 人 サントル、アンテルナ シヨナル、ド、ルシエルシュ、デルマトロジック
フランス国ヴァルボヌヌ06560、ソフィア・アンティポリ(番地なし)

⑲ 代 理 人 弁理士 中島 宣彦 外1名
最終頁に続く

明細書の淨書(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称

蛋白質の架橋による微小球体の製造方法、得られた微小球体及びその用途

2. 特許請求の範囲

(1) 界面活性剤を添加した有機溶剤から成る連続相と少くとも1種の蛋白質を含有する親水性凝集相から成る不連続相とから成る乳濁液をかきまぜてよつて調整し、得られた乳濁液にカルボジイミドを添加して架橋を活性化しそして微小球体の生成物を得、そして前記生成物を分離し洗浄することと等価とする、乳濁液中での架橋による蛋白質微小球体の製造方法。

(2) 連続相に添加する界面活性剤がソルビタンエステルである前項(1)に記載の方法。

(3) 不連続相が水性相である前項(1)または(2)に記載の方法。

(4) 水性相が限定されたpHに緩衝されている前項(3)に記載の方法。

(5) 不連続相が水と混合し得る有機溶剤と水性相

との混合物である前項(1)または(2)に記載の方法。

(6) 有機溶剤がソルチルホルムアミドである前項(5)に記載の方法。

(7) カプセル化される製品が不連続相中に溶解されている前項(3)～(5)のいずれかに記載の方法。

(8) 不連続相に還元剤を添加する前項(1)～(7)のいずれかに記載の方法。

(9) 連続相を構成する溶剤が不連続相と混合しない溶剤である前項(1)～(8)のいずれかに記載の方法。

(10) 連続相を構成する溶剤が脂肪族C₈～C₁₀炭化水素または環式脂肪族C₅～C₈炭化水素である前項(9)に記載の方法。

(11) 連続相を構成する溶剤がシクロヘキサンである前項(10)に記載の方法。

(12) 連続相を構成する溶剤がポリシロキサンである前項(11)に記載の方法。

(13) カルボジイミドが構造式



(この式で、RとR'とは同一または異つていて、H、分枝状または非分枝状の脂肪族C₁～C₁₀基、

ヘチ原子を含有するまたは含有していない環式脂肪族基、または芳香族基であり、これらの基は1つまたはそれ以上の酸性または塩基性置換基を持つことができる)

で表わされる、前項(1)~(2)のいずれかに記載の方法。

(4)カルボジイミドが1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドである前項(3)に記載の方法。

(5)活性化剤の他に触媒を導入する前項(1)~(4)のいずれかに記載の方法。

(6)触媒がスチンシイミドである前項(4)に記載の方法。

(7)触媒がN-ヒドロキシスチンシイミドである前項(6)に記載の方法。

(8)微小球体化薬物を水または緩衝液の何れかで洗浄するか、1つの段階は水での少なくとも1回の洗浄からなり、他の段階は無水の溶剤での洗浄からなる2段階で洗浄する前項(1)~(7)のいずれかに記載の方法。

つ化合物を含有させるための、前項(8)に記載の微小球体の使用。

3. 発明の詳細な説明

本発明は微小球体の製造方法とかくして得られる微小球体の用途とに関する。

蛋白質は微小球体またはマイクロカプセルの製造のため広く使用されて来た。得られる微小球体またはマイクロカプセルは、特に薬剤中で、例えば徐放薬物の調製用または特別な器官への薬物導入のための賦形薬として用いられている。

微小球体またはマイクロカプセルの乳濁液中での滴かけ方法は既知であり、それによれば蛋白質は2官能性反応物例えばグルタルアルデヒドまたは環ジクロリドにより横かけされる。これらの方法によれば、2官能性反応物は横かけされた蛋白質中に残留して凝を形成する。この方法は蛋白質間に人工的スパーサーを導入すると云う不利な点を持つている。

更に、カルボキシル基とアミノ基との間の反応はカルボジイミドおよび(または)スチンシイミ

ド無水の溶剤がエタナルアルコールである前項(8)に記載の方法。

(9)少なくとも1つの活性物質を微小球体中に組入れる前項(1)~(8)のいずれかに記載の方法。

(10)微小球体への活性物質の組入れを、架橋工程の後で、前記微小球体を、組入れるべき活性物質を含有する溶液中に浸すことにより行う前項(9)に記載の方法。

(11)微小球体への活性物質の組入れを、微小球体を製造する際に達成させる前項(9)に記載の方法。

(12)前項(1)~(8)のいずれかに記載の方法により得られる、イソペプチド型の架橋により架橋された、1種またはそれ以上の蛋白質の微小球体。

(13)前項(9)~(12)のいずれかに記載の方法により得られる、イソペプチド型の架橋により架橋された、1種またはそれ以上の蛋白質の微小球体。

(14)前項(9)に記載の微小球体の、結口交与できる組成物中でのおよび乾燥した薬物の形態での、希釈剤または流動化剤としての使用。

医薬学的、化粧品学的または生物学的活性を持

ド導体によつて活性化されることが知られている。特に、蛋白質のカルボキシル基と遊離アミノ基との反応による蛋白質の横かけを活性化させるために、これらの化合物が提案されてきた。この場合イソペプチド型の直接的な横かけが行われる。この型の横かけは、スポンジまたはシート形のコーゲンに高く、横かけされたマトリックス製造に関する国際出願第WO 85/04113号に記載されている。この方法によれば、作業は水性相中で行われ、コーゲンをカルボジイミドおよび(または)2官能性スチンシイミドとエステルと反応させ、後、その混合物を高温で加熱してコーゲンに高く横かけされたマトリックスを得る。フランス特許出願第A 2,280,352号は、ポリスチレンラテンクスの不活性粒子を含有する緩衝されている水性懸濁液中、カルボジイミド存在の下で請求蛋白質を横かけし、後、その混合物を加熱または強固に放置して、ポリスチレンラテンクスの吸収された横かけ蛋白質を得た。

前記文書中には、乳濁液の形で反応を行ったも

のではないし、均一な微小球体を得ているものはない。

本発明によれば、活性化剤としてのカルボジイミド存在の下、乳化法により、イソペプチド型の直接的な橋の形成により、蛋白質から微小球体を調製できることが発見された。この微小球体の有利な点は、若し放出されると生物学的に有害または刺激性であるかもしれない反応物と蛋白質とを共有結合で結合させていないことである。従つて本発明によれば、必然的に蛋白質間にスパーサーが存在すると云う先行技術の不利さが回避される。

従つて、本発明は、連続相が界面活性剤が添加されている有機溶剤からなり、不連続相が少くとも1つの蛋白質を含有する親水性液体相からなる乳濁液を準備し乍ら調製し、カルボジイミドを前記乳濁液に添加して、蛋白質の橋かけを活性化し、微小球体の沈降物を得、前記沈降物を分離し、洗浄することを特徴とする、乳濁液中での橋かけによる蛋白質微小球体の製造方法に関する。

連続相に添加する界面活性剤はこの相に可溶で、

微小球体を形成させるのに用いられる蛋白質はペプチド型の橋を形成できるどんな蛋白質でもよい。また異なる蛋白質の混合物を用いることもできる。それには、人、動物または植物由来の蛋白質、例えば酵素、キャリアー蛋白質（ヘモグロビンまたは血清アルブミン）、栄養蛋白質（オパールビンまたはカゼイン）、構造蛋白質（クラチン、I、II、IIIまたはB型のコラーゲンあるいはゼラチン）、或る種の防御または抗体蛋白質または免疫調節蛋白質および種々の他の蛋白質例えば酵素、膜受容体あるいはホルモンを挙げてもよい。更に特別には、血清アルブミンとリゾチームとが用いられる。これらの橋はイソペプチド型であり、蛋白質のNH₂基とCOOH基との反応により得られる。SH基またはOH基もまたCOOH基と橋を形成することができ。

連続相を構成する溶剤は不連続相と混合しない疎水性溶剤または疎水性溶剤の混合物である。特に、脂肪族C₅〜C₁₀炭化水素または環式脂肪族C₅〜C₈炭化水素、更に特別にはシクロヘキサンを

乳濁物を、その親水相が有機相に分散するように配向させる。この界面活性剤は、例えばソルビタンエステルでもつてもよい。

第1の態様によれば、不連続液体相は水性相であり、その場合、蛋白質とカルボジイミドとは前記水性相に溶解している。その水性相は好ましくは限定されたpHの緩衝溶液である。カプセル化を所望する水性性製品は、若し適当ならばこの水性相に溶解させる。活性素の溶解を可能にする溶剤は、若し適当ならば添加してもよい。

第2の態様によれば、不連続液体相は水性相と水に混合する有機溶剤との混合物である。後者は好ましくはジメチルホルムアミド(DMF)である。事実、その高い溶剤力によつて、DMFは水に不溶の分子を溶解させることができ、水に不溶の製品、例えば薬物のカプセル化を可能にする。こうしてカプセル化する製品をその有機溶剤を含有する混合物中に溶解させておくことができる。還元剤例えばソチオエリトリールの不連続相への添加は収率を改善する。

用いる。また、ポリシロキサン例えばヘキサメチルシロキサンまたは低粘度または液体であるポリメチルシロキサンおよびポリシメチルシロキサンも用い得る。

橋かけ反応活性化剤として用いられるカルボジイミドは構造式



(この式で、RとR'とは同一または異り、H、分枝または分枝してない脂肪族C₁〜C₁₀基、ヘテロ原子を含有していても、いなくともよい環式脂肪族基または芳香族基である)

で表わされる。これらの基は反応副生成物の溶解を可能にする、1つまたはそれ以上の酸性または塩基性置換基を持つていることができる。更に特別には1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩化物、以下EDC1、HClと記す。を用いる。

好ましい態様によれば、活性化剤としてのカルボジイミドに加えて、触媒を用いることができる。この触媒はスチンニミド、特別にはN-ヒドロ

キシタクシンイミドである。触媒は蛋白質と共に不連続相中に導入する。蛋白質の濃かけをカルボジイミドとN-ヒドロキシタクシンイミドとの存在の下に行う場合、その濃かけ反応を図1図1に示すごとく書くことができる。この反応は明らかに、カルボジイミドは環の形成に関与していないことを示して、それは引続き簡単な洗浄により除去できる尿素誘導体に変わる。

その反応の終に微小球体の生成物が得られ、隣返し水で洗浄して副生成物例えばカルボジイミドから誘導される尿素を除去するか、あるいは、特にその微小球体がカプセル化されている薬物を含む、その薬物を抽出したくない場合には適当な水性の緩衝液で洗浄する。

若し必要ならば、洗浄を2段階で行うことができる。副生成物例えばカルボジイミドおよびN-ヒドロキシタクシンイミドから誘導される尿素を除去するために行う水での洗浄に加えて、不連続媒体相と混合しない連続相を除去するために水での洗浄の前または後で、無水溶剤での洗浄、例え

ばエタナルアルコールでの洗浄を加えてもよい。

洗浄後得られる球体は乾燥、適当ならば凍結乾燥し、必要ならば還元媒質中パーコール勾配によつて精製する。乾燥球体中に尿素が存在しないことはクロマトグラフィー分析により点検できる。

洗浄後得られる微小球体はその微小球体により固定したい物質の溶液と接触させることができる。固定に必要な接触時間の後、微小球体を洗浄し、乾燥する。

使用される反応物の量は作業条件に従つて変えることができる。次の例を挙げてもよい。

1. 水性不連続相を用いるアルブミンの場合：蛋白質500mg当りEDCI.HCl 200～600mg用いる。
2. 水中DMF 20重量多で構成される不連続相を用いるアルブミンの場合：蛋白質500mg当りEDCI.HCl 200～600mg用いてもよい。

微小球体製造温度は一般に2～40℃で、反応時間は変えることができ、少くとも5時間である。

本発明はまた新製品として、イソプロパノールの蒸気だけで濃かけされている1つまたはそれ以上の

蛋白質の微小球体に関し、その微小球体は例えば前記して定義した方法で得られる。

得られる微小球体の特性は使用蛋白質の型、不連続相の本性および使用した反応物の量に従つて異なつてもよい。表1は微小球体が異なる機械的および物理化学的挙動を持つことができることを示している。更に、適当した不連続相によつて、得られる微小球体は消化酵素により多かれ少かれ劣化される。それ故、多かれ少かれ生分解される微小球体が期待される適用の型に従つて得られてもよい。

表 1

パラメーター	水性不連続相			DMF20wt% を含む不連続相
	蛋白質	アルブミン	リゾチーム	アルブミン
EDCI.HCl濃(1) [*]	300mg	600mg	1,370mg	200mg
物理的外観	球状で強い		球状で弱い	球状で強い
収 率	25%	80%	-	90%
消化酵素抵抗	抵抗		-	-
荷 電	負		-	負

(1)^{*} 使用蛋白質500mg当りの量
EDCI.HCl 1-エタナル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩

蛋白質の等電点に従い反応液質のpHを選ぶことにより、正電荷または負電荷を持つ微小球体を得ることができる。こうして、本発明に従う微小球体はイオン性の製品例えば薬物をカプセル化したものは固定することができる。

得られる微小球体の直径は3μmから1mmまで変り得る。得られる微小球体の寸法は攪拌の速さと用いられる乳化システムとに左右される。両相液を用いることにより、10μm以下の直径を持つ微小球体を高い百分率で得られるかもしれない。また外部有機相中に適当な安定化剤を導入することにより小さい直径の微小球体を得ることができる。

本発明に従う微小球体は数多くの応用をもつ。

荷電を持たない微小球体はマッソーを用または皮膚清浄のため化粧品薬液中に組入れることができる。この場合、微小球体ならびに生物学的性質の類似物例えば角質細胞の完全に蛋白質の性質が移用される。荷電をもたない微小球体はまた乾燥薬剤形式中および経口投与することができる組成物中の希釈剤または流動化剤としても用いられる。

微小球体は薬学的、化粧品または生物学的活性を持つ化合物を含有させるために用いることができる。特にそれは、薬物例えば消毒剤、抗真菌剤、抗菌剤、抗炎症剤、レタノイドまたはアントラノイド、化粧品例えば顔面塗料または日光フィルターあるいは生活性物質用の賦形薬として役立てることができる。製品は微小球体製造時にカプセル化することもできるし、微小球体のイオン性を考慮して、カプセルになつている製品の前後に微小球体を覆ふことにより固定することもできる。

微小球体は不安定な薬物を保護できる。それは特別な皮膚の訴え例えば成るしれたる様な条件の場合局所的に適用できる。

薬物を持つている微小球体はまた全身的に投与することでもできる。

微小球体組成物においては、球体に生物学的(免疫学的または酵素の)性質を与える特別な蛋白質を含ませることもできる。

微小球体は着色剤を持つことができメイクアップ

次の処方にて製造する。

顔かけされているアルブミン微小球体、 φ=100 μm	5.00 g
セチルステアリアルアルコール	5.00 g
エチレンオキシド20モルを含有するポリオキシ エチレン化セチルステアリアルアルコール	0.70 g
エチレンオキシド12モルを含有する ポリオキシエチレン化	
セチルステアリアルアルコール	0.30 g
セチルアルコール	1.50 g
グリセロールモノステアレート	2.00 g
ワセリン油	6.00 g
メチルパラ-ヒドロキシベンゾエート	0.08 g
プロピルパラ-ヒドロキシベンゾエート	0.07 g
シリコーン油	1.00 g
無菌水	77.35 g
皮膚の手入れに用いることができる滑らかなク リームを得る。微小球体は見分けられるが、その 構造から軟い質感である。	

実施例3 キナクリンを持つ微小球体を含有するセラタンカプセル

プ製品に用いられることができる。

以下に与えられる例は純粋に説明として、何等
限定を意味することなく、本発明の理解を一層よ
くさせる。

実施例1 マッサージクリーム

次の処方にて製造される。

顔かけされているアルブミン微小球体 100 μm < φ < 200 μm	7.00 g
乳化ソリノールアルコール、ワツクスおよび 炭化水素に高く精製物の混合物 "BDP"社より商品名"Anhydrous Rucerin" で販売されるもの	37.00 g
メチルパラ-ヒドロキシベンゾエート	0.07 g
プロピルパラ-ヒドロキシベンゾエート	0.08 g
無菌水	55.85 g

均一な外観をもつ比較の濃厚なクリームを得る。
適用の場合、クリームは層様の割合を持ち、微
小球体は皮膚上で見分けられ、マッサージ効果を
増強する。

実施例2 皮膚滑剤クリーム

キナクリンは通常経口的に投与される駆虫剤で
あり、抗マラリア剤である。本実施例に従い、キ
ナクリンを徐放できるように微小球体中に持たせ
て薬学的組成物を製造することを提案する。キナ
クリンを持つ微小球体は各微小球体500mgを含有
するセラタンカプセルの形で提供される。

問題の微小球体の調製には、キナクリン塩酸塩
50mg、ついでアルブミン500mgを水2mlに溶解す
る。それから全体を、Dow Corning社からPlaid
Dow Corning 344の名の下に販売され、Cyclome
thiconeの名で(以下これを用いる)表はされる
この揮発性シリコーンに、商品名Span 85の下に
ICI社で販売されているソルビタントリオレエー
トを5重量部添加したポリジメチルシロキサン20
mg中で、実施例4に記載の条件下に3分間乳化化
する。EDCI-HC600mgを水1mlに溶解し、前記の
乳濁液を添加する。攪かけ工程を、攪拌しながら
光を遮断して12時間続ける。攪かけ終了時、微
小球体は強い黄色沈降物の形で得られ、遠心分離
し、水40mlで洗浄し、凍結乾燥する。

顕微鏡の下で観察すると、凍結乾燥した製品はよく分離された形の微小球体で、実質的に、微小球体の外側には結晶を見ることができない。回収率は使用蛋白重量に対し75重量%であり、微小球体中のキナリンのカプセル化収率は1重量%である。

実施例4

メチレン青を水性不連続相中のアルブミン微小球体中にカプセル化する。メチレン青200μと血清アルブミン500μとを水2ml中に溶解し、全体を、Span 85 5重量%添加したCyclomethicone 15ml中で乳化する。縮型羽根をもつ攪拌機をつけ、それを500回転/分の速さで回転させている、50mlのフラスコ中で乳濁液を製造する。3分間攪拌後EDCI.HCl 300μを含有する水性溶液1mlを添加する。この標かけ工程を一定の攪拌の下、外部相の高液を抜けながら5時間続ける。5時間後、得られた微小球体は強い青色の沈殿物の形で、それを速心分離し、エタノールで1回、洗いで水で2回洗浄する。その洗浄はメチレン青の放出を制限

するよう非常に速に行う。それから微小球体を凍結乾燥する。カプセル化されたメチレン青の収率は、水性媒質中でその微小球体を磨砕した後、 $\lambda = 655.8 \text{ nm}$ の分光測光測定により測定される。カプセル化されたメチレン青の収率は微小球体の全重量に対し1重量%である。

実施例5

メチレン青を無水不連続相中で血清アルブミン中に閉じ込める。メチレン青(200μ)とN-ヒドロキシスクシンイミド(100μ)とをジメチルホルムアミド2ml中に溶解する。それに血清アルブミン(500μ)を添加し、超音波タンク中で3分間分散する。全体を実施例4と同じ作業条件下、Span 85を5重量%添加してあるCyclomethicone 15ml中に乳化する。EDCI.HCl 10μをジメチルホルムアミド1mlに溶解し、それからその乳濁液に導入する。標かけ、洗浄、凍結乾燥およびカプセル化されたメチレン青の収率の測定は実施例4に比べると同様に行う。カプセル化されたメチレン青の収率は0.5の重量%である。

水中でのメチレン青放出についての曲線を実施例4と5との微小球体について比較した。第2図に示す曲線は、メチレン青の百分率放出量に分て表わした時間の関数として示している。曲線1は水中EDCI.HClの使用、曲線2はジメチルホルムアミド中EDCI.HClの使用に対応している。

メチレン青の放出が不連続水性相を用いて製造したアルブミン微小球体の場合非常に遅らされていることが判かる。メチレン青の半量は、無水相中で製造した微小球体の場合2分間で放出され、水性相中で製造された微小球体の場合35分かかって放出されている。

両方の微小球体の場合、メチレン青の90%以上は90分後に放出されている。

4. 図面の簡単な説明

第1図はカルボジイミドとN-ヒドロキシスクシンイミドの存在下における蛋白質の架橋反応を説明する簡略的説明図であり、第2図は水中でのメチレン青放出曲線を示す簡略的説明図である。

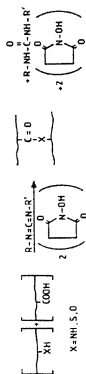


FIG. 1

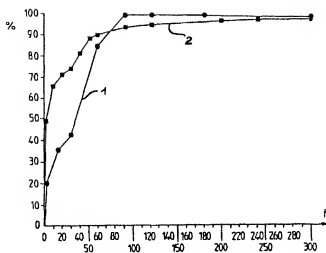


FIG. 2

第1頁の続き

- | | | |
|------|--------------------|--|
| ④発明者 | フロランス、ゴダイユ | フランス国パリ75014、リユー・アレ 41番 |
| ④発明者 | ジャン・クロード、ジ
アムール | フランス国ムーガン06250、アレー・ド・ラ・グランジュ
52番 |
| ④発明者 | ブラハム、シュルルト | フランス国アンティープ06600、シユマン・ド・ヴァル・
ボスケ、アモー・ド・ヴァル・ボスケ、ヴィラ 35 |

三井物産株式会社(方式)

平成 1年12月18日

特 許 庁 長 官 殿

1. 事件の表示 平成1年特許願第210801号

2. 発明の名称 蛋白質の集積による微小球体の製造方法、得られた微小球体及びその用途

3. 補正をする者 事件との関係 特許出願人

サントル、アンテルナショナル、ド、ルシエルシュ、
デルマトロジック

4. 代理人 東京都港区赤坂1丁目1番14号

溜池東急ビル 電話504-0782

(5013) 弁理士 中 島 宣 彦



5. 補正命令の日付 平成1年11月13日
(平成1年11月28日発送)

6. 補正の対象 明細書の浄書(内容に変更なし)

7. 補正の内容 別紙のとおり



Cited Document 3
(Partial Translation)

5 METHOD FOR PRODUCING MICROSPHERES BY CROSSLINKING PROTEINS, THE
 OBTAINED MICROSPHERES, AND USE THEREOF

CLAIMS

1. A method for producing protein microspheres by crosslinking in an emulsion,
10 comprising the steps of preparing an emulsion which comprises a continuous phase
 comprising an organic solvent supplemented with a surfactant and a discontinuous phase
 comprising a hydrophilic liquid phase containing at least one type of protein by stirring;
 activating crosslinking by adding a carbodiimide to the obtained emulsion; obtaining a
 precipitate of the microspheres; and separating and washing the aforementioned
15 precipitate.
2. The method of claim 1, wherein the surfactant added to the continuous phase is a
 sorbitan ester.
- 20 3. The method of claim 1 or 2, wherein the discontinuous phase is an aqueous phase.
4. The method of claim 3, wherein the aqueous phase is buffered at a defined pH.
5. The method of claim 1 or 2, wherein the discontinuous phase is a mixture of an
25 aqueous phase and an organic solvent which may be water-miscible.
6. The method of claim 5, wherein the organic solvent is dimethylformamide.
7. The method of any one of claims 3 to 6, wherein a product to be encapsulated is
30 dissolved in the discontinuous phase.
8. The method of any one of claims 1 to 7, wherein a reducing agent is added to the
 discontinuous phase.
- 35 9. The method of any one of claims 1 to 8, wherein a solvent constituting the continuous
 phase is a solvent immiscible with the discontinuous phase.

10. The method of claim 9, wherein the solvent constituting the continuous phase is an aliphatic C₅₋₁₀ hydrocarbon, or a cycloaliphatic C₅₋₈ hydrocarbon.

5 11. The method of claim 10, wherein the solvent constituting the continuous phase is cyclohexane.

12. The method of claim 9, wherein the solvent constituting the continuous phase is polysiloxane.

10

13. The method of any one of claims 1 to 12, wherein the carbodiimide is represented by the structural formula:



(wherein R and R' are the same or different and represent H, a branched or unbranched aliphatic C₁-C₁₀ group, a cycloaliphatic group containing or not containing a heteroatom, or an aromatic group, and these groups may have one or more acidic or basic substituents).

15

14. The method of claim 13, wherein the carbodiimide is 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide.

20

15. The method of any one of claims 1 to 14, wherein a catalyst is introduced in addition to an activator.

16. The method of claim 15, wherein the catalyst is a succinimide.

25

17. The method of claim 16, wherein the catalyst is *N*-hydroxysuccinimide.

18. The method of any one of claims 1 to 17, comprising washing the microsphere precipitate using either water or buffer, or washing the microsphere precipitate in two steps wherein the first step comprises washing at least once with water, and the next step is washing with an anhydrous solvent.

30

19. The method of claim 18, wherein the anhydrous solvent is ethyl alcohol.

20. The method of any one of claims 1 to 19, wherein at least one active substance is incorporated into the microsphere.

35

21. The method of claim 20, wherein the incorporation of an active substance into the microsphere is carried out after the crosslinking process by soaking said microsphere into a solution containing the active substance to be incorporated.
- 5 22. The method of claim 20, wherein the incorporation of an active substance into the microsphere is accomplished when producing the microsphere.
- 10 23. A microsphere of one or more types of proteins forming isopeptide-type crosslinks, which is obtained by the method of any one of claims 1 to 19.
24. A microsphere of one or more types of proteins forming isopeptide-type crosslinks, which is obtained by the method of any one of claims 20 to 22.
- 15 25. Use of the microsphere of claim 23 as a diluent or a fluidization agent in a composition that can be administered orally and in a dry pharmaceutical form.
- 20 26. Use of the microsphere of claim 24 for inclusion of a compound having pharmaceutical, cosmetic, or biological activity.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to methods for producing microspheres and uses of the obtained microspheres.

- 25 Proteins have been widely used for the production of microspheres or microcapsules. The obtained microspheres or microcapsules are being used particularly in pharmaceutical agents as excipients, for example, for introducing drugs into specific organs or for preparing controlled-release drugs.

- 30 Crosslinking methods for microspheres or microcapsules in an emulsion are known, and according to them, the protein is crosslinked using a bifunctional reactant such as glutaraldehyde or an acid dichloride. In these methods, the bifunctional reactant remains within the crosslinked proteins to form a bridge. These methods have the disadvantage that they introduce an artificial spacer between the proteins.

- 35 Furthermore, reactions between carboxyl groups and amino groups are known to be activated by carbodiimide and (or) succinimide derivatives. These compounds have been proposed particularly for activating crosslinking between proteins by reactions between the

carboxyl groups and free amino groups of proteins. In this case, a direct isopeptide-type bridge is formed. This type of linkage has been described in International Application No. WO 85/04413 relating to production of collagen-based crosslinked matrices in sponge or sheet form. In this method, the operation is done in the aqueous phase, collagen is made to come in contact with a carbodiimide and (or) a bifunctional succinimidyl ester, and then this mixture is heated to a high temperature to obtain the collagen-based crosslinked matrix. According to the French Patent Application No. A 2,280,352, a toxic protein was crosslinked in the presence of a carbodiimide in a buffered aqueous medium containing inactive particles of polystyrene latex, subsequently this mixture was heated or left to stand at room temperature to obtain a crosslinked protein absorbed on polystyrene latex.

In none the above-mentioned documents is the reaction performed in the form of an emulsion, and in none of them are homogeneous microspheres obtained.

According to the present description, the inventors discovered that microspheres can be prepared from proteins by formation of direct isopeptide-type bridge through an emulsification method in the presence of a carbodiimide as an activating agent. An advantage of such a microsphere is that the biologically harmful or stimulatory reactant to be released and the protein are not covalently bonded. Therefore, the present invention avoids the disadvantage present in the conventional technology which is the inevitable presence of spacers between the proteins.

Therefore, the present invention relates to methods for producing protein microspheres through crosslinking in an emulsion, comprising the steps of preparing an emulsion which comprises a continuous phase comprising an organic solvent supplemented with a surfactant and a discontinuous phase comprising a hydrophilic liquid phase containing at least one type of protein by stirring; activating crosslinking of proteins by adding a carbodiimide to the aforementioned emulsion; obtaining a precipitate of the microspheres; and separating and washing the aforementioned precipitate.

The surfactant added to the continuous phase is soluble in this phase and orients the emulsified substance so that the hydrophilic phase is dispersed in the organic phase. This surfactant may be, for example, a sorbitan ester.

According to a first embodiment, the discontinuous liquid phase is an aqueous phase, and in such case, the protein and carbodiimide are dissolved in the aqueous phase. The aqueous phase is preferably a buffer solution at a defined pH. A water-soluble product to be encapsulated is dissolved in this aqueous phase when appropriate. Solubilizers which enable solubilization of an active substance may be added when appropriate.

According to a second embodiment, the discontinuous liquid phase is a mixture of an aqueous phase and a water-miscible organic solvent. The latter is preferably dimethylformamide (DMF). In fact, DMF can solubilize molecules which are insoluble in

water through its high solvent power, and enables encapsulation of water-insoluble products such as drugs. This way, a product to be encapsulated can be dissolved in a mixture containing such an organic solvent. Addition of a reducing agent such as dithioerythritol to the discontinuous phase improves the yield.

- 5 **The protein used to form the microspheres may be any protein that can form peptide-type bridges. Mixtures of different proteins may also be used. Examples of these proteins include human-, animal-, or plant-derived proteins such as enzymes, carrier proteins (hemoglobin or serum albumin), nutrient proteins (ovalbumin or casein), structural proteins (keratin, collagen of type I, II, III or IV or gelatin), certain defense or**
 10 **antibody proteins or immunoregulatory proteins, and various other proteins such as toxins, membrane receptors or hormones. Especially, serum-albumin and lysozyme are used.** These bridges are of the isopeptide type and are obtained by reaction of NH_2 groups with COOH groups of proteins. The SH or OH groups can also form bridges with the COOH groups.

- 15 The solvent which constitutes the continuous phase is a hydrophobic solvent or a mixture of hydrophobic solvents, which is immiscible with the discontinuous phase. In particular, an aliphatic $\text{C}_5\text{-C}_{10}$ hydrocarbon or a cycloaliphatic $\text{C}_5\text{-C}_8$ hydrocarbon is used, and more especially cyclohexane is used. Polysiloxanes, such as hexamethyldisiloxane or paper clay, or polymethylsiloxanes and polydimethylcyclsiloxanes which are fluid may also be used.

- 20 The carbodiimide used as a crosslinking reaction activator is represented by the structural formula:



- (wherein, R and R' are identical or different and represent H, a branched or unbranched aliphatic $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ group, a cycloaliphatic group which may or may not contain a heteroatom, or an aromatic group). These groups can carry one or more acidic or basic substituents which enable
 25 solubilization of the reaction by-products. Especially, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide chloride, hereinafter referred to as EDCI-HCl, is used.

- According to a preferred embodiment, a catalyst may be used in addition to the carbodiimide serving as the activator. This catalyst is a succinimide, especially
 30 *N*-hydroxysuccinimide. The catalyst is introduced into the discontinuous phase together with the protein. When the crosslinking of proteins is carried out in the presence of a carbodiimide and *N*-hydroxysuccinimide, the crosslinking reaction can be depicted as shown in Figure 1. This reaction shows clearly that the carbodiimide does not participate in the bridge formation, and that it is converted to a urea derivative which can
 35 subsequently be removed by simple washing.

At the end of the reaction, a precipitate of microspheres is obtained, which can be

washed repeatedly with water to remove the by-products, for example the urea derived from the carbodiimide, or with an appropriate aqueous buffer, especially in the case where the microspheres contain an encapsulated medicament and one does not wish to extract this drug.

The diameter of the obtained microspheres may vary from 3 μm to 1 mm. The size of the obtained microspheres depends on the speed of stirring and on the emulsifying system used. By using sonication, a high percentage of microspheres having a diameter of 10 μm or less may be obtained. It is also possible to obtain microspheres of small diameter by introducing a suitable stabilizing agent into the external organic phase.

The microspheres according to the present invention have numerous applications.

The uncharged microspheres can be incorporated into cosmetic vehicles for massage or for skin cleansing. In this case, the genuinely protein-like character of the microspheres and substances having similar essential biological qualities such as corneal cells are utilized. The uncharged microspheres can also be used as diluents or fluidizing agents in dry pharmaceutical forms and in compositions which can be administered orally.

The microspheres can be used for containing compounds possessing pharmaceutical, cosmetic or biological activity. In particular, they can serve as an excipient for drugs such as antiseptics, antifungal agents, antibacterial agents, anti-inflammatory agents, retinoids or anthranoids, cosmetic agents such as hair dyes or sunlight filters, or biologically active substances. The products can be encapsulated at the time of producing the microspheres or can be fixed by soaking the microspheres in a solution of the capsulated product, considering the ionic character of the microspheres.

The microspheres can protect unstable drugs. They can be applied topically in the case of particular skin complaints such as certain dripping conditions.

The microspheres loaded with drugs can also be administered systemically.

It is also possible to include in the microsphere composition, special proteins which impart biological (immunological or enzymatic) properties to the spheres.

The microspheres can be loaded with colorants and used in make-up products.

The Examples provided below further illustrate the present invention. However, these Examples are only provided for illustrations of the present invention, and the present invention should not to be construed as being limited thereto.

EXAMPLE 1

Massage cream

- 5 The following prescription is used for the production:

Crosslinked albumin microspheres, $100\ \mu\text{m} < \phi < 200\ \text{Mm}$	7.00 g
Mixture of emulsifying lanolin alcohols, waxes, and refined oils based on hydrocarbons, sold under the trade name of "Anhydrous Rucerin" by the company "BDP"	37.00 g
Methyl <i>para</i> -hydroxybenzoate	0.07 g
Propyl <i>para</i> -hydroxybenzoate	0.08 g
Sterile water	55.85 g

A relatively thick cream having a homogeneous appearance was obtained. When applied, the cream had a greasy texture and the microspheres were discernible on the skin and enhanced massaging effects.

- 10

EXAMPLE 2

Skin cleansing cream

The following prescription is used for the production:

Crosslinked albumin microspheres, $\phi = 100\ \mu\text{m}$	5.00 g
Cetyl stearyl alcohol	5.00 g
Polyoxyethylenated cetyl stearyl alcohol containing 20 moles of ethylene oxide	0.70 g
Polyoxyethylenated cetyl stearyl alcohol containing 12 moles of ethylene oxide	0.30 g
Cetyl alcohol	1.50 g
Glycerol monostearate	2.00 g
Vaseline oil	6.00 g
Methyl <i>para</i> -hydroxybenzoate	0.08 g
Propyl <i>para</i> -hydroxybenzoate	0.07 g
Silicone oil	1.00 g
Sterile water	77.35 g

- 15 A smooth cream which can be used for skin care was obtained. The microspheres were discernible but had a soft texture because of their structure.